Ein säulenchromatographisches Verfahren zur Auftrennung der Jodaminosäuren im Serum unter besonderer Berücksichtigung der Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin

Georg Hallhuber

1972

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Komm. Direktor: Professor Dr. M. M. Forell

EIN SÄULENCHROMATOGRAPHISCHES VERFAHREN ZUR AUFTRENNUNG DER JODAMINOSÄUREN IM SERUM UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER TRENNUNG VON TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN+

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Georg H a l l h u b e r
aus München

München 1970

+Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. P.C. Scriba

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M.M. Forell

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1972

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

MIT; $M^{127}IT$	Monojodtyrosin - ^{127}Jod (stabiles Nuklid)
$M^{125}IT$	Monojodtyrosin - ^{125}Jod (instabiles Nuklid)
DIT; $D^{127}IT$	Dijodtyrosin - ^{127}Jod (stabiles Nuklid)
$D^{125}IT$	Dijodtyrosin - ^{125}Jod (instabiles Nuklid)
T_3; T_3-^{127}J	L - Trijodthyronin - ^{127}Jod (stabiles Nuklid)
T_3-^{125}J	L - Trijodthyronin - ^{125}Jod (instabiles Nuklid)
T_3-^{131}J	L - Trijodthyronin - ^{131}Jod (instabiles Nuklid)
T_4; T_4-^{127}J	Thyroxin - ^{127}Jod (stabiles Nuklid)
T_4-^{125}J	Thyroxin - ^{125}Jod (instabiles Nuklid)
T_4-^{131}J	Thyroxin - ^{131}Jod (instabiles Nuklid)
$PB^{127}I$	Protein Bound Iodine (proteingebundenes Jod)
TG	Thyreoglobulin
mCi; µCi	Milli-Curie; Mikro-Curie
µg	Mikrogramm
M	molar
N	normal
IPM	Impulse pro Minute
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
ml	Milliliter

INHALT

LISTE DER ABKÜRZUNGEN
1. EINLEITUNG
2. EXPERIMENTELLER TEIL
2.1. Chromatographische Trennung der ^{125}J-markierten Standards von L-Trijodthyronin (T_3), L-Thyroxin (T_4) Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT)
2.1.1. Theoretische Überlegungen
2.1.2. Präparation der Dextrangelsäulen
2.1.3. Arbeitsstandard von Trijodthyronin und Thyroxin bzw. von Mono- und Dijodtyrosin
2.1.4. Auftragen der Proben
2.1.5. Fraktionssammeln und Zähltechnik
2.1.6. Ergebnisse
2.1.6.1. Auftrennung der T_3-^{125}J- und T_4-^{125}J-Standards
2.1.6.2. Abtrennung der Jodtyrosine M^{125}IT von den Jodthyroninen T_3 und T_4
2.2. Abtrennung der Schilddrüsenhormone von den Serumproteinen
2.2.1. Abtrennung auf alkalisierten Sephadexsäulen
2.2.1.1. Theoretische Überlegungen
2.2.1.2. Methodik
2.2.1.3. Ergebnisse
2.2.1.4. Änderung einzelner Parameter der Versuchsanordnung
2.2.1.4.1. Größere Sephadexmenge
2.2.1.4.2. Änderung der Temperatur
2.2.1.4.3. Zusammensetzung des Puffers
2.2.1.5. Verhalten der Jodtyrosine MIT und DIT bei Seruminkubation
2.2.1.6. Diskussion der Ergebnisse
2.2.2. Abtrennung der Proteine auf Ionenaustauschern
2.2.2.1. Theoretische Überlegungen

2.2.2.2. Wahl des geeigneten Austauschers
2.2.2.3. Präparation der Austauschersäule
2.2.2.4. Auftragen der Inkubationsgemische
2.2.2.4.1. Kontrollserum
2.2.2.4.2. Patientenserum
2.2.2.5. Elution
2.2.2.6. Ergebnisse

2.3. Einengen der Eluate

2.3.1. Ammoniakeluat vom Austauscher
2.3.1.1. Theoretische Überlegungen
2.3.1.2. Methodik
2.3.1.3. Ergebnis

2.3.2. Eluate von der Sephadexsäule
2.3.2.1. Theoretische Überlegungen
2.3.2.2. Methodik
2.3.2.3. Ergebnis

2.4. Bestimmung der prozentualen Anteile von Jodaminosäuren im Serum von radiojodtherapierten Patienten

2.4.1. Theoretische Überlegungen
2.4.2. Patienten
2.4.3. Methodik
2.4.4. Ergebnisse
2.4.5. Spezifität der Methode

3. DISKUSSION
4. ZUSAMMENFASSUNG
5. LITERATUR
6. LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Die Bestimmung des proteingebundenen Jods ($PB^{127}I$) und der T_3-in-vitro Test sind, zusammengenommen mit dem Radiojodspeicherungstest zuverlässige Parameter zur Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. Nur 7 % der hyperthyreoten Patienten weisen keinen beschleunigten Radiojodumsatz auf; bei nur weniger als 5 % findet sich kein erhöhtes $PB^{127}I$ oder sog. freies T_3 (10).

Dennoch sind diese Methoden durch zahlreiche Störfaktoren belastet. So erhält man z.B. bei operativ verkleinerter Schilddrüse einen beschleunigten Radiojodumsatz, ohne daß eine Hyperthyreose vorliegen muß (15,16,22,29). Die Einnahme z.B. von Antiovulantien bewirkt falsch hohe PBI-Werte (3,6). Verantwortlich hierfür sind z.T. die veränderten Verteilungs- und Bindungsverhältnisse der Schilddrüsenhormone im Serum.

Abb. 1:

$$\text{Freies } T_4 \begin{cases} + \; TBK_{ec} \rightleftharpoons \left[T_4 \times TBK_{ec}\right] \\ + \; TBK_{c} \rightleftharpoons \left[T_4 \times TBK_{c}\right] \end{cases}$$

nach INGBAR, FREINKEL.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, liegt nur 1 % der Gesamthormonmenge, dargestellt durch T_4 auf der linken Seite der Formel, als freies, biologisch wirksames Schilddrüsenhormon vor (13). Der überwiegende Teil (99 %) ist einerseits gebunden an die extrazellulären Serumproteine TBK_{ec}. Diese sind thyroxinbindendes Präalbumin (TBPA), Albumin sowie thyroxinbindendes Globulin (TBG). Andererseits werden die Schilddrüsenhormone an zelluläre Bestandteile (TBK_c); das sind im wesentlichen die Erythrozyten, gebunden.

Die Gesamtmenge an L-Thyroxin ist normalerweise 30mal so hoch (25), wie die des L-Trijodthyronin. Dabei ist T_3 etwa 5 - 10mal stärker biologisch aktiv. Der Grund hierfür liegt sicher zum Teil in der wesentlich stärkeren Serumproteinbindung des T_4 (1,17,23). Bei exogener Zufuhr von Trijodthyronin bzw. bei Verschiebung des T_3/T_4-Verhältnisses in Richtung T_3 kann trotz erniedrigtem bzw. normalem $PB^{127}I$ eine euthyreote bzw. hyperthyreote Stoffwechsellage vorliegen.

Deshalb war es Ziel unserer Versuche, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubte, im Serum T_3 und T_4 getrennt voneinander zu bestimmen. Dabei mußten folgende Schritte bewältigt werden:

1. Quantitative Abtrennung der Schilddrüsenhormone von den Trägerproteinen des Serums
2. Auftrennung der Jodthyronine T_3 und T_4, bzw. Abtrennung der Thyronine von den Hormonvorstufen MIT und DIT
3. Konzentrierung der jeweiligen Elutionspeaks und Bestimmung des Verteilungsverhältnisses $Q = \frac{T_3}{T_4} \times 100$.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Chromatographische Trennung der ^{125}J-markierten Standards von L-Trijodthyronin(T_3), L-Thyroxin(T_4) Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT)

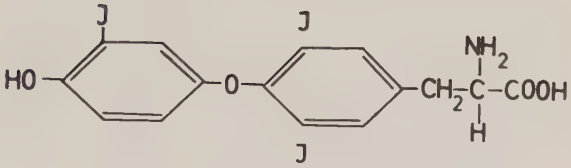
2.1.1. Theoretische Überlegungen

Bekanntlich wirken Dextrangele aufgrund ihrer untereinander vernetzten Polysaccharidketten wie ein Molekularsieb, das Stoffe nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Daneben spielen Adsorptionsvorgänge eine bedeutende Rolle. So werden z.B. aromatische Verbindungen bevorzugt adsorbiert (9).

Die in Abb. 2 dargestellten Jodthyronine T_3 und T_4 bzw. Jodtyrosine MIT und DIT unterscheiden sich durch je ein Jodatom und durch die damit verbundene unterschiedliche Dissoziation der phenolischen Hydroxylgruppe (18).

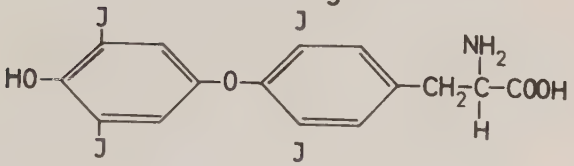
Abb. 2: pK-Werte der phenolischen Hydroxylgruppe von Jodaminosäuren

pK=8,45



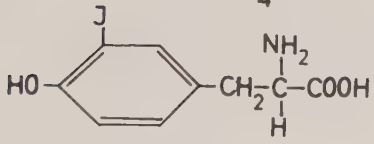
L Trijodthyronin(T_3)

pK=6,73



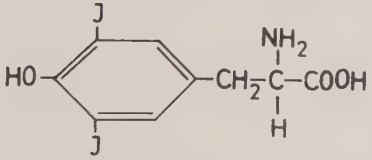
L Thyroxin(T_4)

pK=8,2



Monojodtyrosin(MIT)

pK=6,36



Dijodtyrosin (DIT)

2.1.2. Präparation der Dextrangelsäulen

Für unsere Versuche benutzten wir zylindrische Standardsäulen (h=18 cm, d=1,2 cm), die mit jeweils 4 g bzw. 5 g des stark vernetzten Dextrangels Sephadex G-25 superfine (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden) gefüllt wurden. Das Gel wurde über Nacht in Aqua bidest. gequellt und nach dem Aufrühren im Quellgefäß in dünner Suspension in die Säule geschlemmt. Nach dem Absedimentieren des Gelbettes wurden die Säulen mit Glasstopfen verschlossen und, wenn nicht anders beschrieben, über eine Präzisionsschlauchpumpe (Fa. Ismatec, Zürich/ 13-canal-micro-pump) an ein Puffervorratsgefäß mit 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 in 10 % Äthanol angeschlossen und mit diesem Puffer äquilibriert (Gelbetthöhe nach Stabilisation 15 cm). Die Pumpgeschwindigkeit stellten wir durch Wahl des entsprechenden Schlauchdurchmessers auf 0,5 ml pro Minute ein. Die Säulen wurden anfangs für jeden Versuch neu bereitet.

2.1.3. Arbeitsstandard von Trijodthyronin-^{125}Jod bzw. Thyroxin-^{125}Jod

0,2 mCi L-Trijodthyronin-^{125}Jod bzw. L-Thyroxin-^{125}Jod (in ca. 1 ml wässriger Propylen-Glykol-Lösung, Trijodthyronin-Thyroxingehalt 10 - 18 µg, Radiochemical Centre, Amersham/England) wurden mit sterilem 0,06 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf ein Gesamtvolumen von 200 ml gebracht (Arbeitsstandard). Diese Lösung (1 µCi T_3-^{125}J bzw. T_4-^{125}J und 0,05 - 0,09 µg T_3 bzw. T_4 pro ml) wurde in Bleimänteln im Kühlraum (+4°C) aufbewahrt.

In gleicher Weise wurden die Arbeitsstandards der Jodtyrosine M^{125}IT bzw. D^{125}IT (Radiochemical Centre, Amersham/England) hergestellt.

2.1.4. Auftragen der Proben

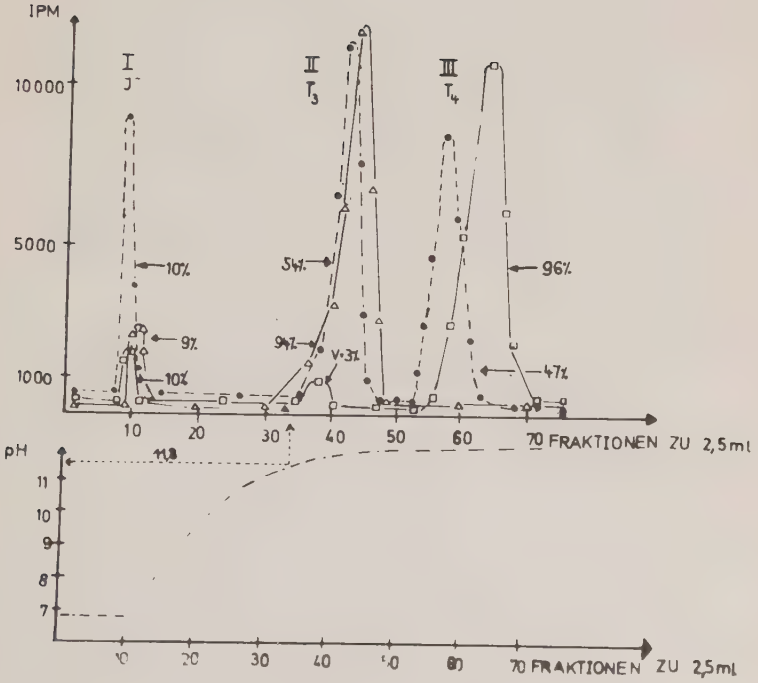
Nach Absaugen des über dem Dextrangel stehenden Pufferüberstandes wurden auf die Säulen jeweils 0,5 ml Standardlösung bzw. ein 1:1 Gemisch (1 ml) dieser Standardlösungen aufgetragen. Die gleichen Mengen wurden zur Bestimmung der Gesamtaktivität verwendet.

Nach dem Einsinken der Proben wurde der Säulenrand über dem Gelbett mit 1 ml 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 in 10 % Äthanol gespült; anschließend wurden die Säulen über die Schlauchpumpe wieder an das Puffervorratsgefäß angeschlossen. Wenn nicht anders beschrieben, wurde bei Zimmertemperatur ca. 20°C eluiert.

2.1.5. Fraktionssammeln, Zähltechnik und Auswertung

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die jeweiligen Eluate mit einem automatischen Fraktionssammler in 5 Min.-Fraktionen entsprechend einem 2,5 ml-Volumen pro Fraktion gesammelt und an einem Gammameßplatz (Gammaguard Fa. Tracerlab) gemessen. Bei einer Zeitvorwahl von 1 Min. lag der statistische Meßfehler unter 1 %. Nach Abzug des Nulleffektes wurden die einzelnen Impulsraten in ein Diagramm eingetragen und die prozentualen Anteile der Aktivitätsgipfel, bezogen auf die Gesamtaktivität, errechnet.

Abb. 3: Chromatographie auf Sephadex G-25 superfine
Gradientenelution
Präparation von drei Säulen mit 4 g Sephadexgel
siehe 2.1.2.
Auftragen von 0,5 ml folgender Standards:
T_3-^{125}J (Δ——Δ), T_4-^{125}J (□——□),
T_3-^{125}J + T_4-^{125}J in 1 ml Gemisch (●----●)
vgl. 2.1.4.
Gradientenelution wie unter 2.1.6.1.



2.1.6. Ergebnisse

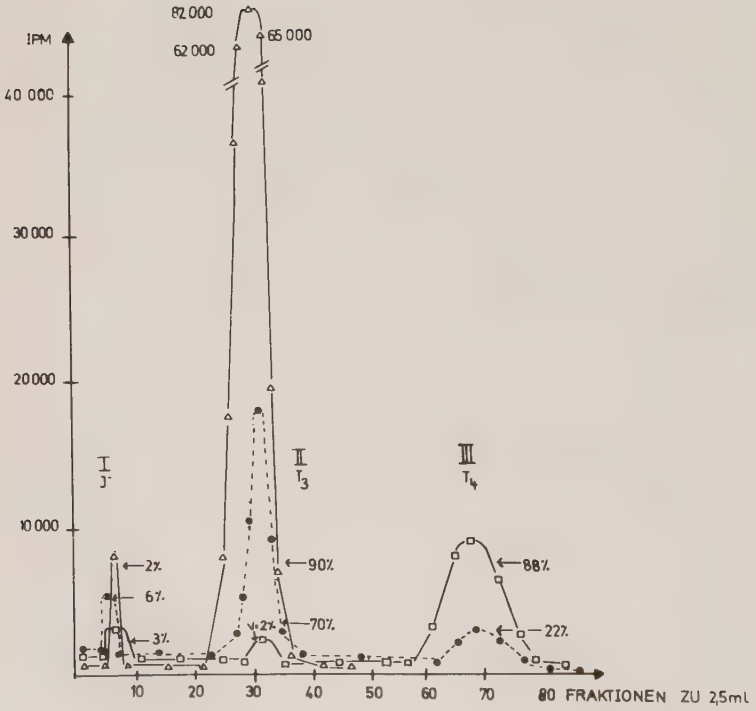
2.1.6.1. Auftrennung der T_3-^{125}J- und T_4-^{125}J-Standards

Im sauren Milieu werden die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 stark an Dextrangel adsorbiert (28). Die Stärke der jeweiligen Adsorption nimmt mit steigendem pH des Elutionsmittels ab. Zur Ermittlung des pH-Wertes, bei welchem die markierten Hormone T_3 und T_4 aufgrund ihrer unterschiedlichen Adsorption selektiv vom Gel abgelöst werden und getrennt im Eluat erscheinen, wurde eine Gradientenelution durchgeführt (siehe Abb. 3). Dazu wurde die Säule zunächst mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 vorgespült und nach Auftragen der Standards durch Zuleiten von 0,1 N NaOH in das Puffervorratsgefäß mit einem Gradienten (Abb. 3) eluiert. Dabei wurde zu 250 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 (Vorratsgefäß) 0,1 N NaOH unter Ersatz des Elutionsvolumens zugeführt.

Wie Abb. 3 zeigt, können T_3 und T_4, sowohl bei Auftragen der Einzelsubstanzen wie eines Gemisches, in zwei sauber voneinander getrennten Peaks eluiert werden.

Wie aus Abb. 3 weiter zu ersehen ist, erschien eine Trennung bei pH 11,8 am günstigsten. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Versuchen, bei welchen die Säulen von vornherein mit Puffer pH 11,8 äquilibriert und eluiert wurden, bestätigt werden. Durch Verwendung von 5 g Sephadex G-25 superfine (vorher 4 g) bzw. durch Zugabe von Äthanol 10 % zum Puffer ließ sich eine noch bessere Abtrennung erreichen (siehe Abb. 4).

Abb. 4: Chromatographie auf Sephadex G-25 superfine
Elution mit 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,8
Präparation von drei Säulen mit 5 g Sephadexgel
vgl. 2.1.2.
Auftragen der Standards: (vgl. Abb.3)
T_3-^{125}J (Δ——Δ), T_4-^{125}J (□——□),
T_3-^{125}J + T_4-^{125}J (•----•) in 1 ml Gemisch
siehe 2.1.4.



Bei der Chromatographie des T_4-Standards fand sich an der Stelle des T_3-Gipfels ein Anteil von ca. 3 % der Gesamtaktivität (vgl. Abb. 3, Abb. 4, Peak V). Bei Rechromatographie einer aliquoten Menge des Eluates von Peak III ergab sich kein Aktivitätsgipfel mehr an der Stelle des T_3. Es handelt sich also offenbar um eine durch Dejodierung entstandene "T_3-Verunreinigung" des T_4-Standards, deren prozentualer Anteil mit zunehmendem Alter des Standards größer wurde. Der T_3-Standard wies keinerlei Verunreinigung durch T_4 auf (vgl. Abb. 3).

Der vor den beiden "Hormongipfeln" gelegene Peak I enthält das im Standard durch Dejodierung entstandene Jodid und stieg prozentual mit zunehmendem Alter der aufgetragenen Standards an.

Die unterschiedliche prozentuale Verteilung von T_3-^{125}J und T_4-^{125}J bei Auftragen im Gemisch (vgl. Abb. 3, Abb. 4) erklärt sich aus der unterschiedlichen Aktivität der T_3-^{125}J- und T_4-^{125}J-Standards. In Abb. 3 waren die Impulsraten der beiden Standards gleich groß. Während im Versuch der Abb. 4 T_4-^{125}J aufgrund des höheren Alters der Lösung einen geringeren Anteil an der Gesamtaktivität (22 %) hatte. Die Halbwertszeit von ^{125}J beträgt 60 Tage.
Die Wiederfinderaten lagen zwischen 90 % und 100 %.

2.1.6.2. Abtrennung der Jodtyrosine MIT und DIT von den Jodthyroninen T_3 und T_4

Zur Frage der Spezifität der T_3- und T_4-Gipfel mußte geprüft werden, wo die Hormonvorstufen MIT und DIT in dem oben beschriebenen System wandern.

Abb. 5: Chromatographie von Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) auf Sephadex G-25 superfine
Drei 5 g-Säulen siehe 2.1.2., Auftragen von 0,2 ml folgender Standards; $M^{125}IT$ (x—x), $D^{125}IT$ (o—o) T_3-^{125}J + T_4-^{125}J in 1 ml Gemisch (•---•) vgl. 2.1.4., Elution mit 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 in 10 % Äthanol, vgl. Abb. 4.

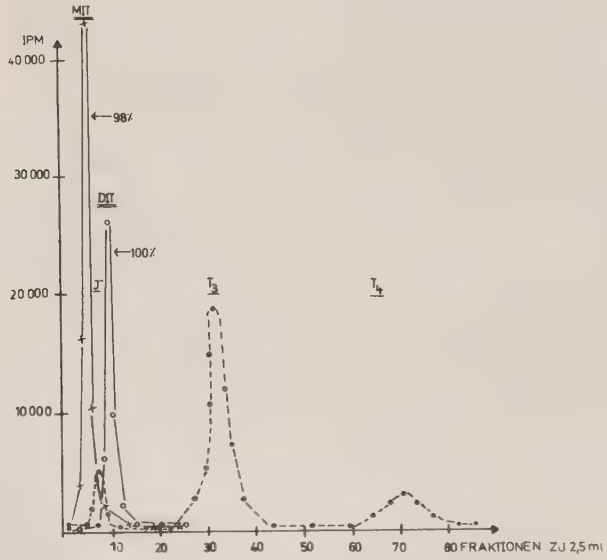


Abb. 5 zeigt, daß MIT und DIT deutlich von T_3 und T_4 abgetrennt sind.

2.2. Abtrennung der Schilddrüsenhormone von den Serumproteinen

2.2.1. Abtrennung auf alkalisierten Sephadexsäulen

2.2.1.1. Theoretische Überlegungen

Nachdem es uns möglich war, auf Sephadex G-25 superfine Standards der Jodthyronine T_3 bzw. T_4, sowie die Jodtyrosine MIT und DIT zu trennen, mußte der Einfluß der Serumproteinbindung der Hormone auf die chromatographische Trennung untersucht werden. Das Ziel dieser Untersuchung war, auf einer Sephadexsäule einerseits die Serumproteine von den Schilddrüsenhormonen T_3 und T_4 abzutrennen und andererseits diese wiederum in zwei getrennten Peaks zu eluieren.

Es ist bekannt, daß Dextrangel kompetitiv in die Serumproteinbindung der Schilddrüsenhormone eingreift (11), also diese von den bindenden Proteinen freisetzt. Dieser Effekt ist abhängig von der Serum- bzw. Dextrangelmenge, ferner von der Temperatur, dem pH und der Ionenstärke der Elutionslösung (28).

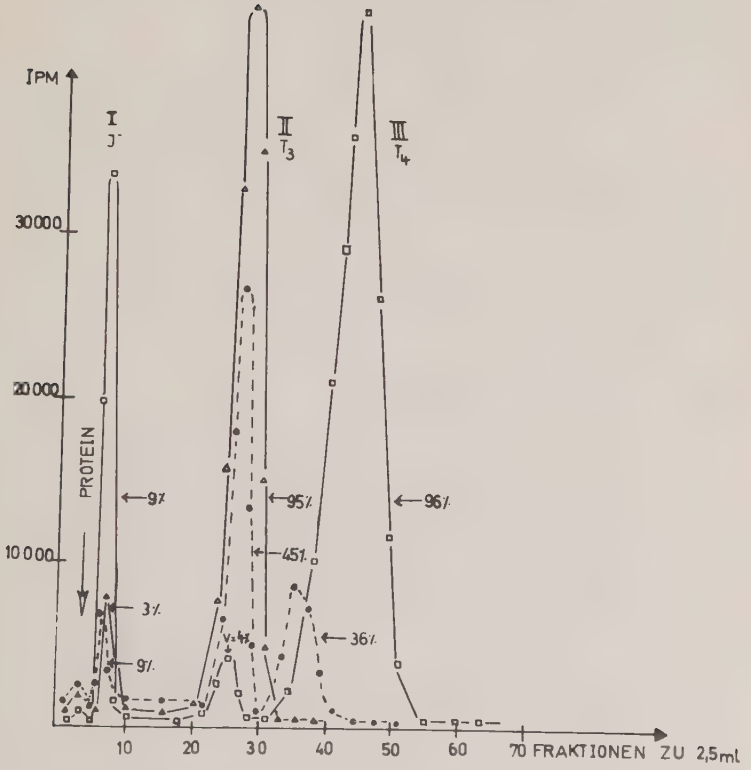
2.2.1.2. Methode

Zur Überprüfung der Frage, ob eine T_3-T_4-Trennung im Serum mit dem unter 2.1. beschriebenem System möglich ist, wurden folgende Versuche ausgeführt:

0,5 ml T_3- bzw. T_4-Standard, sowie 0,2 ml MIT- bzw. DIT-Standard (höhere Impulsraten der Jodtyrosinstandards) wurden mit Humanserum (2 ml, 3 ml, 4 ml) bei 37°C im Wasserbad etwa 20 Min. inkubiert. Diese Zeit reicht nach früheren Erfahrungen (26) zur Äquilibrierung zwischen endogenem und zugesetztem radioaktivem Schilddrüsenhormon einerseits und den Serumproteinen andererseits aus. Von dem Inkubationsgemisch wurden verschiedene Mengen (1 ml - 5 ml) in dem unter 2.1. beschriebenem System - Sephadexsäule bei pH 11,8 - chromatographiert.

Ebenso wurde Serum von Patienten chromatographiert, denen im Rahmen einer Radiojodtherapie ^{131}J verabreicht worden war. Anstelle der Standards setzten wir den Seren entsprechende Mengen Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (Lösungsmittel für Standards) zu, um vergleichbare Versuchsbedingungen zu haben.

Abb. 6: Chromatographie von Seruminkubationsgemischen auf Sephadexsäulen
Präparation von drei Säulen siehe 2.1.2., Inkubationsgemisch jeweils 1 ml wie unter 2.2.1.2. angegeben, Inkubation mit T_3-Standard (Δ——Δ), Inkubation mit T_4-Standard (□——□) Inkubation mit T_3+T_4 im Gemisch (●----●), Elution wie in Abb. 4



2.2.1.3. Ergebnisse

Abb. 6 zeigt, daß schon beim Auftragen von 1 ml Inkubationsgemisch das Intervall zwischen T_3- und T_4-Gipfel kleiner wird (vgl. Abb. 3). Versuche mit größeren Mengen an Inkubationsgemisch (2 ml, 3 ml, 4 ml) zeigten, daß die T_3-T_4-Trennung mit zunehmender Serummenge schlechter wird. Auch eine vorhergehende Denaturierung der Serumproteine durch Zugabe von 1 N Kalilauge zum Inkubationsgemisch brachte keinen Erfolg.

Mit Radiojodseren erzielten wir noch unbefriedigendere Ergebnisse, so daß wir zunächst die Versuchsanordnung durch größere Sephadexmengen, höhere Temperaturen und andere Pufferlösungen zu verbessern suchten.

2.2.1.4. Änderung einzelner Parameter der Versuchsanordnung

2.2.1.4.1. Größere Sephadexmenge

Zur Vergrößerung des Gelbettes wurden zwei Standardsäulen mit drei und vier Gramm Sephadex G-25 superfine hintereinander geschaltet und wie üblich eluiert. (vgl. Abb. 4). Inkubationsgemisch wie unter 2.2.1.2. beschrieben.

Abb. 7: Chromatographie von Seruminkubationsgemischen auf zwei hintereinandergeschalteten Sephadexsäulen mit 3 g und 4 g Dextrangel
Aufgetragenes Inkubationsgemisch jeweils 2 ml, Inkubation mit T_4 (□——□), Inkubation mit T_3+T_4 im Gemisch (●- - - -●) siehe 2.2.1.2., Elution siehe Abb. 4

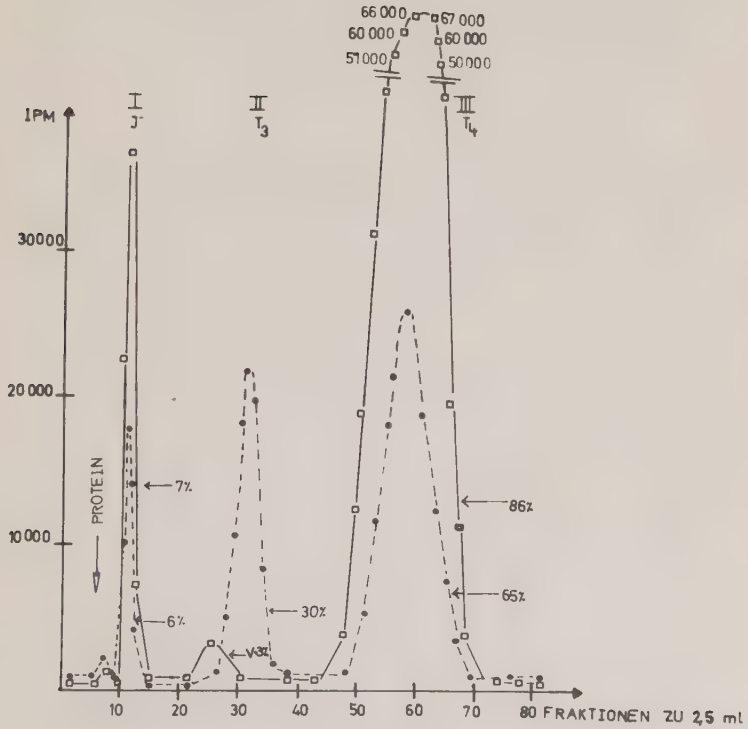
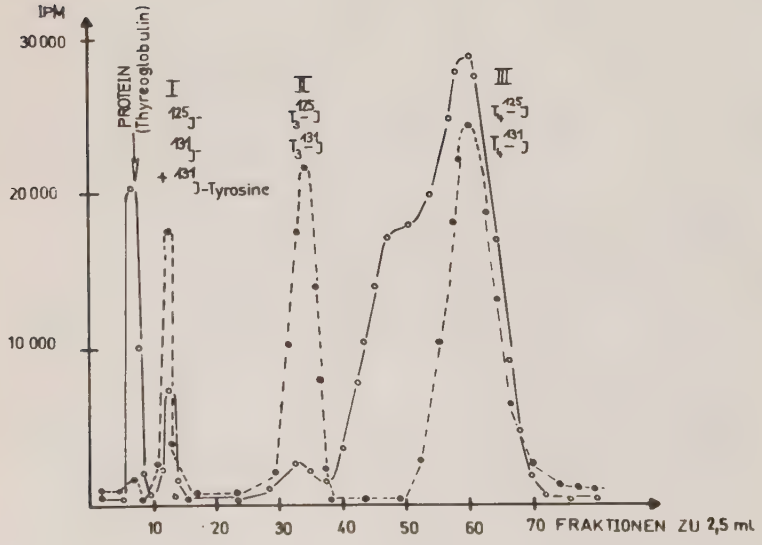


Abb. 7 zeigt, daß mit mehr Sephadexgel bessere Trennungen erzielt werden, wobei die Peaks aber breiter werden. Es konnte mehr Inkubationsgemisch (2 ml) auf das Gelbett aufgetragen werden. Bei Chromatographie von Seren radiojodtherapierter Patienten konnten aber auch durch Verwendung größerer Sephadexmengen keine ausreichenden Trennungen erzielt werden (Abb. 8).

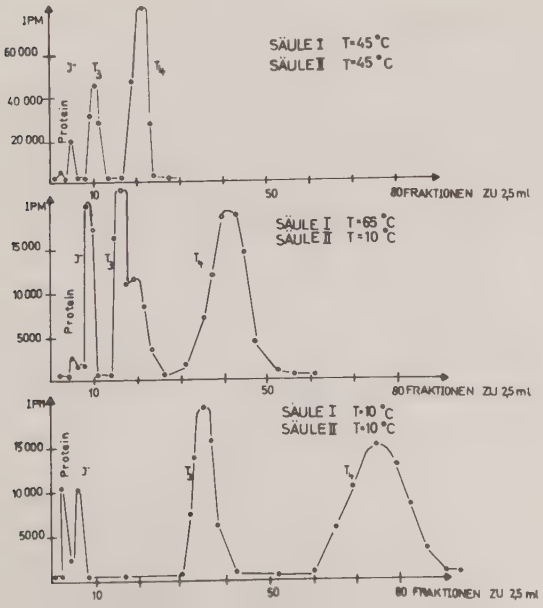
Abb. 8: Chromatographie mit Serum nach Radiojodtherapie und mit Seruminkubationsgemisch auf Sephadex G-25 superfine - zwei hintereinandergeschaltete Säulen mit 3 g bzw. 4 g Gel.
Aufgetragene Menge jeweils 2 ml, Radiojodserum (o—o)
Normalserum mit T_3-^{125}J und mit T_4-^{125}J inkubiert (•---•)
siehe 2.2.1.2. Elution siehe Abb. 4



2.2.1.4.2. Änderung der Temperatur

Zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die T_3-T_4-Trennung koppelten wir zwei Standardsäulen, welche mittels ihres Kühlmantels temperierbar waren. Die Säulen enthielten, wie unter 2.2.1.4.1. beschrieben, drei bzw. vier Gramm Sephadex G-25 supferfine. Es wurde jeweils ein 2 ml-Inkubationsgemisch, wie unter 2.2.1.2. beschrieben, bei verschiedenen Temperaturen chromatographiert.

Abb. 9: Einfluß der Temperatur auf die Chromatographie
Präparation von zwei hintereinandergeschalteten Sephadexsäulen (I und II) mit 3 g bzw. 4 g Gel siehe 2.1.2., 2 ml eines Inkubationsgemisches von markiertem T_3 und T_4 mit Serum (2.2.1.4.1.) aufgetragen, Elution siehe Abb. 4



Bei höherer Temperatur werden die Peaks von T_3 und T_4 schmäler und das freie Intervall erheblich kürzer. Bei niedrigerer Temperatur verbreitert sich das Intervall und ebenso die Aktivitätsgipfel.

2.2.1.4.3. Zusammensetzung des Puffers

Durch höhere Äthanolkonzentration als 10 % (Eiweißdenaturierung) ließ sich keine Trennung der Hormonanteile T_3 und T_4 mehr erreichen. Eine Erhöhung der Puffermolarität von 0,025 M auf 0,1 M brachte keine Verbesserung.

2.2.1.5. Verhalten der Jodtyrosine MIT und DIT bei Seruminkubation

Bei allen Versuchen mit MIT- und DIT-inkubierten Seren ergab sich eine deutliche Abtrennung von T_3 und T_4 wie in Abb. 5 dargestellt.

2.2.1.6. Diskussion der Ergebnisse

Die schlechtere Trennung von T_3 und T_4 erklärt sich aus der wesentlich stärkeren Proteinbindung des T_4 gegenüber T_3 (24). Im Gegensatz zu T_4 wird T_3 schon nach relativ kurzer Laufstrecke aus der Proteinbindung freigesetzt. Da bei unserer Chromatographie T_3 vor T_4 eluiert wird, muß T_4 von T_3 auf der Säule überholt werden. Mit steigender Serummenge einerseits und stärkerer Proteinbindung der Schilddrüsenhormone andererseits (z.B. bei Hypothyreose), verschlechtert sich die Trennung.

2.2.2. Abtrennung der Proteine auf Ionenaustauschern

2.2.2.1. Theoretische Überlegungen

Ionenaustauscher bestehen aus einem unlöslichen Gerüst (Matrix), an das geladene Gruppen (Ionen) chemisch gebunden sind, sowie aus frei beweglichen Gegenionen, die die Ladung der gebundenen Ionen kompensieren. Die Gegenionen lassen sich reversibel gegen andere Ionen gleicher Ladung austauschen, ohne daß die Matrix hiervon beeinträchtigt wird (7).

Trägt die Matrix positive Gruppen, so sind die Gegenionen negativ geladen. Ein derartiger Ionenaustauscher kann negative Ionen austauschen und wird folglich als Anionenaustauscher bezeichnet. Entsprechend enthält die Matrix von Kationenaustauschern angekoppelte negative Gruppen und austauschbare positive Gegenionen (7).

Als Matrix werden beispielsweise Silikate, Kunstharz oder Polysaccharide verwendet. Die Natur der Matrix bestimmt neben der mechanischen Stabilität und den Durchflußeigenschaften auch das Verhalten des Austauschers gegenüber labilen biogenen Substanzen und bis zu einem gewissen Grad auch seine Kapazität (7).

Entscheidend für die Eigenschaften der Austauscher sind jedoch Art und Zahl der geladenen Gruppen. Hierbei legt die Art der funktionellen Gruppen Typ und Stärke des Ionenaustauschers fest, während die Gesamtzahl der Gruppen und ihre Zugänglichkeit, bedingt durch den Grad der Vernetzung, die Austauscherkapazität bestimmen (7).

Für Kationenaustauscher werden zumeist phenolische Hydroxyle, Carboxyl- und Sulfonsäuregruppen in die Matrix eingeführt, für Anionenaustauscher aliphatische oder aromatische Aminogruppen. Dabei ergibt z.B. die Substitution mit Sulfonsäuregruppen stark saure Kationenaustauscher, mit quarternären Ammoniumionen stark alkalische Anionenaustauscher (7).

Die Kapazität ist ein quantitatives Maß für die Fähigkeit eines Ionenaustauschers, austauschbare Gegenionen aufzunehmen. Die totale Kapazität erfaßt die Menge an geladenen oder potentiellen Ionengruppen, die in einem Gramm trockenen Ionenaustauscher enthalten sind (7).

Die ausnutzbare Kapazität umfaßt dagegen nur den Teil der Gesamtkapazität, der unter bestimmten experimentellen Bedingungen tatsächlich verfügbar ist. Sie hängt ab von der Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen, der Konzentration und der Ionenstärke im Trennmedium, sowie der Art der Gegenionen und der Selektivität des Austauschers ihnen gegenüber (7).

2.2.2.2. Wahl des geeigneten Austauschers

Es mußte also möglich sein, auf einem entsprechend vernetzten Austauscher bei entsprechendem pH-Wert die Proteine von den Schilddrüsenhormonen zu trennen. Für die Trennung am günstigsten erwies sich der stark saure Kationenaustauscher Sephadex SE C-25. Dieser Austauscher besitzt eine Polysaccharidmatrix und als aktive Gruppe Sulfäthyl. Die durch den Vernetzungsgrad bedingte Porengröße läßt nur Moleküle mit MW $\leq$ 30 000 in das Innere (funktionelle Gruppen) diffundieren (20).

2.2.2.3. Präparation der Austauschersäule

Es wurden zylindrische Glassäulen (h= 18 cm, d= 1,2 cm) mit einer Kunststofffritte vor der Auslaufkapillare verwendet. Zwei Gramm des stark sauren Kationenaustauschers Sephadex SE C-25 wurden über Nacht in Aqua bidest. gequellt. Vor dem Einfüllen in die Säulen wurde der Überstand über dem gequellten Austauscher dekantiert; darauf wurde 0,1 N Salzsäure dazugegeben und der Austauscher darin aufgeschüttelt. Nach dreimaligem Ausschütteln in 0,1 N Salzsäure wurde der Austauscher in dünner Suspension in die Säulen gefüllt und mittels einer Proportionierpumpe (s.o.) mit 0,1 N Salzsäure gespült (Pumpgeschwindigkeit: 0,5 ml/Min.).

Während des Spülens sedimentierte der Austauscher unter dem Filtrationsdruck der Pumpe. Nach dem Absintern wurde zur Stabilisation der labilen Austauscheroberfläche eine dünne Glaswollschicht über das Gelbett gegeben.

2.2.2.4. Auftragen der Inkubationsgemische

2.2.2.4.1. Kontrollserum

4 ml Normalserum wurden mit einem 1:1 Gemisch (1 ml) aus T_3-^{125}J und T_4-^{125}J 20 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Daraufhin wurde mit 0,2 ml einer 2 N Salzsäure angesäuert. Die Hälfte dieses Gemisches wurde auf die Austauschersäule zur Chromatographie aufgetragen; die andere Hälfte diente zur Bestimmung der Gesamtaktivität. In gleicher Weise wurden Inkubationsgemische mit 0,2 ml $M^{125}IT$- bzw. $D^{125}IT$-Standards bereitet.

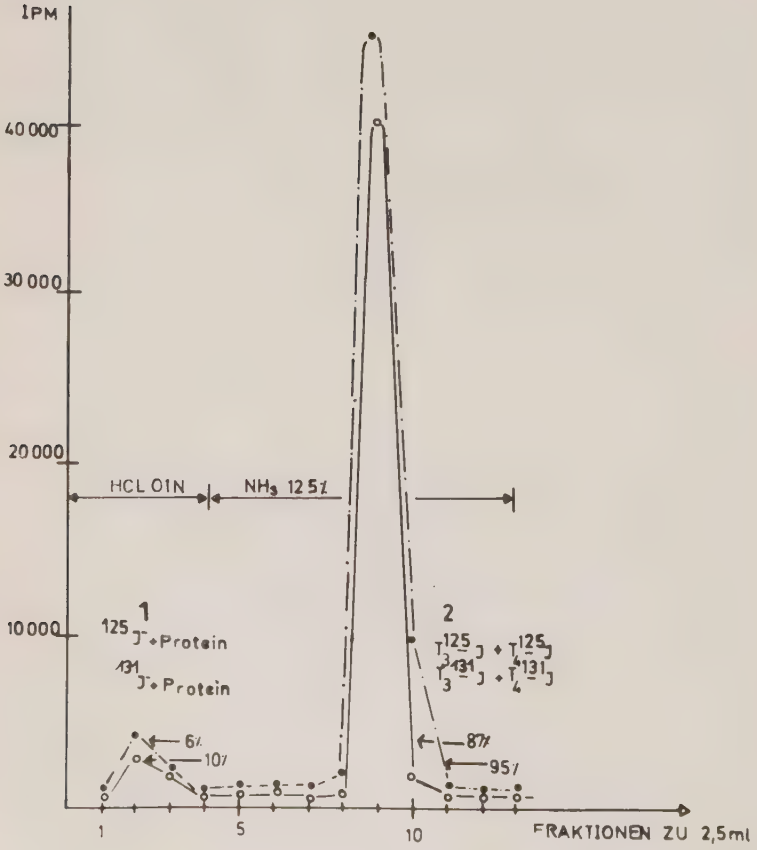
2.2.2.4.2. Patientenserum

Analog zum Kontrollserum wurde von Patienten nach Radiojodtherapie 4 ml mit 1 ml Natriumphosphatpuffer (Lösungsmittel für ^{125}J-Standards) versetzt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wie unter 2.2.2.4.1., d.h. 0,2 ml einer 2 N Salzsäure...., verfahren.

2.2.2.5. Elution

Nach dem Einsinken der aufgetragenen Gemische wurde der Säulenrand über dem Gelbett mit 1 ml 0,1 N Salzsäure nachgespült und die Säulen an das Puffervorratsgefäß über eine Schlauchpumpe (s.o.) angeschlossen. Die Säulen wurden mit konstanter Fließgeschwindigkeit (0,5 ml/Min.) zunächst mit 0,1 N Salzsäure gespült, bis das Protein im Eluat durchgelaufen war (Gelbfärbung der Probengläser). Hierauf wurden die gebundenen Jodaminosäuren entweder mit Ammoniak 12,5 % oder mit 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 eluiert und wenn nicht anders beschrieben, in 5-Minuten-Fraktionen (≙2,5 ml) im automatischen Fraktionssammler gesammelt.
Zur Auswertung siehe 2.1.5.

Abb. 10: Abtrennung der Schilddrüsenhormone von Jodid und den Serumproteinen mittels Ionenaustausch-chromatographie
Präparation von zwei Austauschersäulen mit je 2 g Sephadex SE C-25 siehe 2.2.2.3., Inkubationsgemisch: 2,6 ml Normalserum mit T_3 und T_4 inkubiert (●—·—●) siehe 2.2.2.4.1., 2,6 ml Radiojodserum (o——o) siehe 2.2.2.4.2., Elution wie unter 2.2.2.5.



2.2.2.6. Ergebnisse

Bei der Ionenaustauschchromatographie wird alles Schilddrüsenhormon von den Serumproteinen sowohl bei "exogen" (2.2.2.4.1.) als auch bei "endogen" (2.2.2.4.2.) markierten Seren freigesetzt. Es ergaben sich jeweils zwei Aktivitätsgipfel (Abb. 10). Peak 1 enthält das mit der Proteinfraktion wandernde Jodid, $^{125}J^-$ bzw. $^{131}J^-$.

Bei Radiojodseren wandern im Peak 1 neben ^{131}Jodid, Thyreoglobulin-^{131}J und ein Teil der ^{131}J-markierten Tyrosine (vgl. Abb. 11).

Die Höhe des 1. Aktivitätsgipfels ändert sich auch bei geringeren Austauschermengen (z.B. 1 g statt 2 g) nicht, woraus geschlossen werden kann, daß der Austauscher noch überschüssige Kapazität hat; es wird also keine Hormonaktivität mit dem Protein von der Säule eluiert.

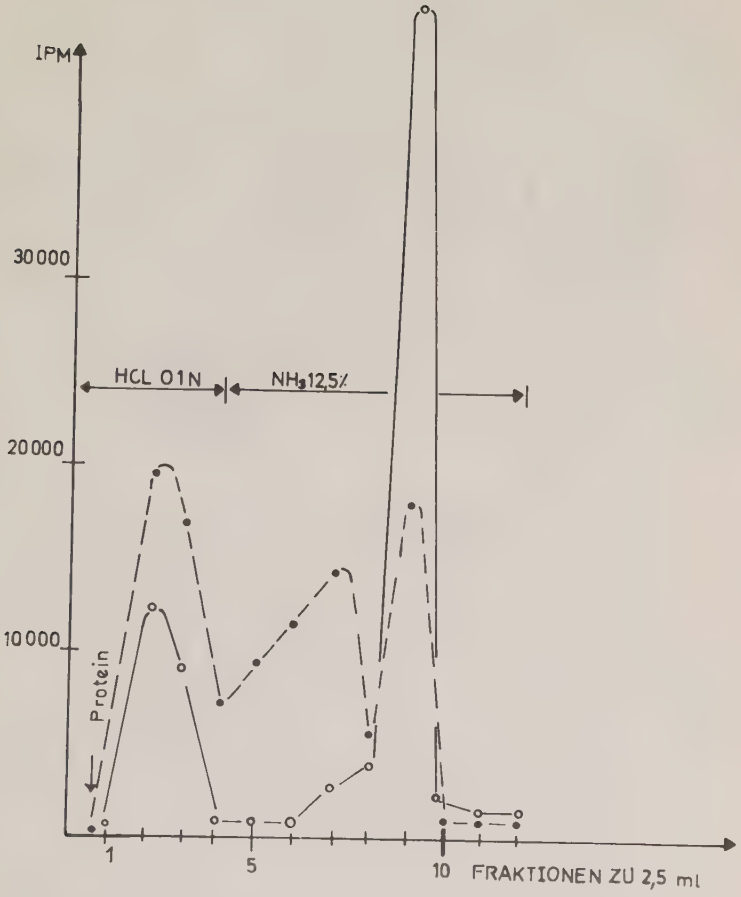
Peak 2 enthält die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 in einem im Vergleich zur Sephadexsäulenchromatographie (Abb. 4) wesentlich kleineren Elutionsvolumen von 10 ml.

Bei Elution mit Kaliumphosphatpuffer wird Peak 2 erheblich breiter, so daß auch hier wie beim Dextrangel ein breiter "Auftragspunkt" auf der anschließenden Trennsäule (Sephadex G-25 superfine) resultiert.

Das Ergebnis der Chromatographie von Inkubationsgemischen mit MIT und DIT (s.o.) ist in Abb. 11 aufgezeichnet.

Abb. 11: Verhalten der Jodtyrosine auf Ionenaustauscher
Präparation von zwei Austauschersäulen
siehe 2.2.2.3.
Inkubation: 2,2 ml mit $M^{125}IT$ inkubiertes Serum (•---•)
2,2 ml mit $D^{125}IT$ inkubiertes Serum (o——o)
siehe 2.2.2.4.1., Elution siehe 2.2.2.5.

Abb. 11:



Hier(Abb. 11) wandert MIT zum größten Teil in einem breiten Peak mit dem Protein bzw. Jodid in Peak 1. DIT kann erst im Ammoniakschritt mit T_3 und T_4 eluiert werden. Die Jodtyrosine werden also zum Teil getrennt.

2.3. Einengen der Eluate

2.3.1. Ammoniakeluat vom Austauscher

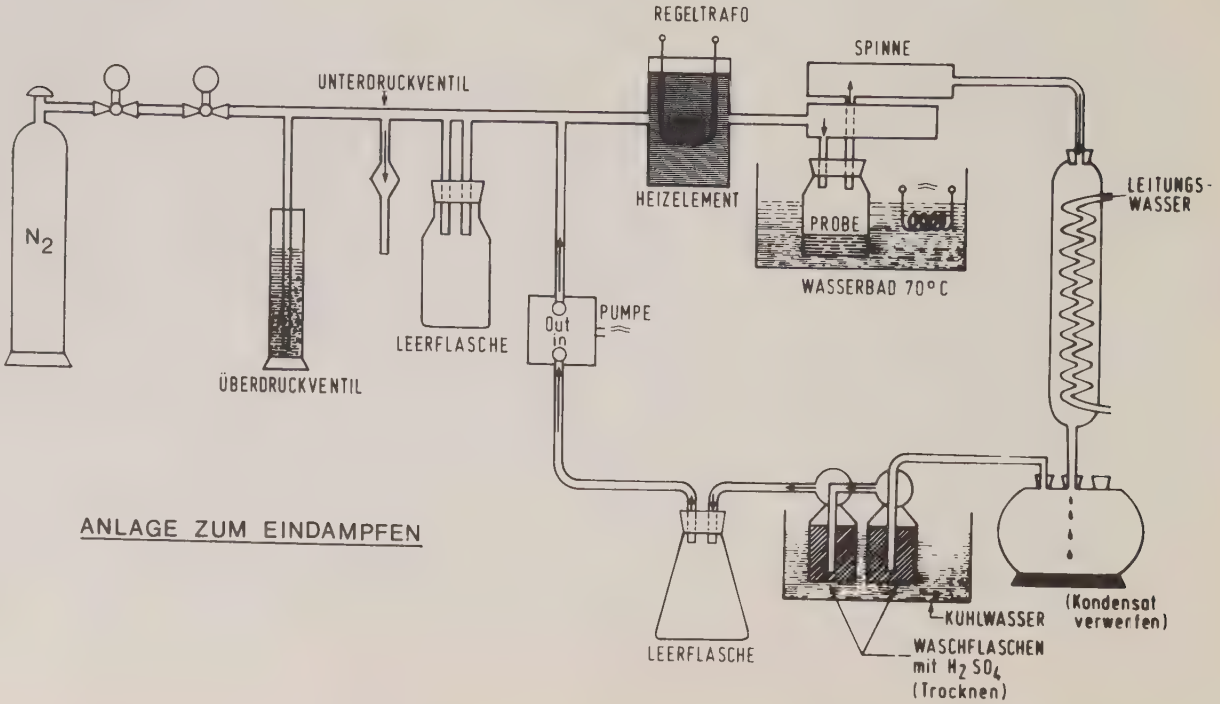
2.3.1.1. Theoretische Überlegungen

Mit Hilfe der unter 2.2.2. beschriebenen Methode erhalten wir die Schilddrüsenhormone bzw. Jodtyrosine in 12,5%igem Ammoniak gelöst (Peak 2 in Abb. 10). Um diese auf Sephadex G-25 superfine chromatographisch trennen zu können, war es notwendig, das Ammoniakeluat zur Trockene einzudampfen, und die verbliebenen Jodaminosäuren wieder in Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 aufzunehmen.

2.3.1.2. Methodik

Das Ammoniakeluat wurde in Einenggläser gesammelt und darauf in ein 70°C temperiertes Wasserbad gestellt, wobei heißer über konzentrierter Schwefelsäure getrockneter Stickstoff durch die Gefäße geleitet wurde. Das abgedampfte Ammoniak kondensierte in einem Kühlsystem. Der Rückstand wurde in 2 ml Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 gelöst und auf Sephadex G-25 superfine weiterchromatographiert.

Abb. 12: Anlage zum Eindampfen unter rezirkulierendem Stickstoff



2.3.1.3. Ergebnis

Die Aktivitätsverluste durch das Eindampfen mit Wiederaufnehmen des Rückstandes schwankten zwischen 20 % und 30 %. Die Verlustraten für T_3 und T_4 waren dabei gleich groß.
Bei Chromatographie der eingeengten Jodaminosäuren auf Sephadex G-25 ergaben sich die gleichen Trennkurven wie unter 2.1. dargestellt (Abb. 4, Abb. 5).

2.3.2. Eluate von der Sephadexsäule

2.3.2.1. Theoretische Überlegungen

Bei der Chromatographie auf Dextrangel erhalten wir die einzelnen Jodaminosäuren in unterschiedlich großen Elutionsfraktionen (vgl. Abb. 4). Um das zeitraubende Fraktionssammeln und -zählen zu umgehen und im Hinblick auf eine bessere Zählausbeute bei den niedrigen T_3-Konzentrationen im Serum von Radiojodpatienten mußten auch hier die Eluate eingeengt bzw. konzentriert werden.

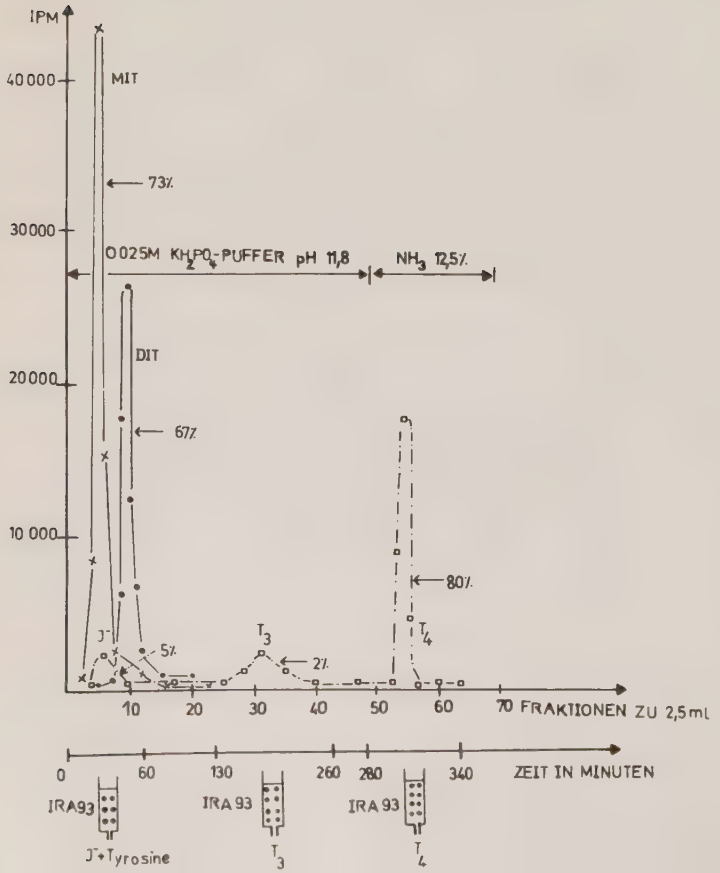
2.3.2.2. Methode

Wir führten eine Zweistufenelution durch. Die Jodtyrosine, Jodid, und T_3 wurden wie üblich mit 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,8 in 10 % Äthanol eluiert. T_4 wurde mit 12,5%igem Ammoniak von der Dextrangelsäule gespült.

Anstatt die Fraktionen einzeln mit dem automatischen Fraktionssammler zu sammeln, leiteten wir das alkalische Eluat der jeweiligen Aktivitätsgipfel I,II,III über eine kleine Säule (Zweimilliliterplastikspritze), die mit stark basischem Anionenaustauscher (Amberlite IRA 93) gefüllt war. Nach der Elution wurden die einzelnen Säulchen im Gammazähler ausgezählt.

Abb. 13: Auftrennung der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 nach Serumproteinabtrennung (Abb. 10); Konzentrierung der Elutionspeaks
Drei Dextrangelsäulen mit 5 g Sephadex G-25 siehe 2.1.2., Aufgetragene Proben:

1. 0,2 ml $M^{125}IT$ (x——x) bzw. $D^{125}IT$-Standard (•——•) in 10 ml NH_3 12,5 % eingedampft und in 2 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen, vgl. 2.3.1.2.
2. 10 ml Ammoniakeluat des Peak 2 (□-·-·-□) vom Radiojodserum (Abb. 10) eingedampft und in 2 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. vgl. 2.3.1.2. Elution siehe 2.3.1.2.



2.4. Bestimmung der prozentualen Anteile von Jodaminosäuren im Serum von radiojodtherapierten Patienten

2.4.1. Theoretische Überlegungen

Mit Hilfe der Ionenaustausch- und der Dextrangelfiltration ist es möglich, auch bei "endogen" markierten Seren die einzelnen Jodaminosäuren voneinander zu trennen. Das Serum von Patienten nach ^{131}J-Behandlung enthält nach 48 Std. - also in der Hormonphase - neben ^{131}Jodid "endogen" markierte Schilddrüsenhormone T_3-^{131}J und T_4-^{131}J sowie deren Vorstufen $M^{131}IT$ und $D^{131}IT$. Wir bestimmten die Radioaktivität der ^{131}J-markierten Jodaminosäuren zur Bemessung der relativen Konzentration im Serum.

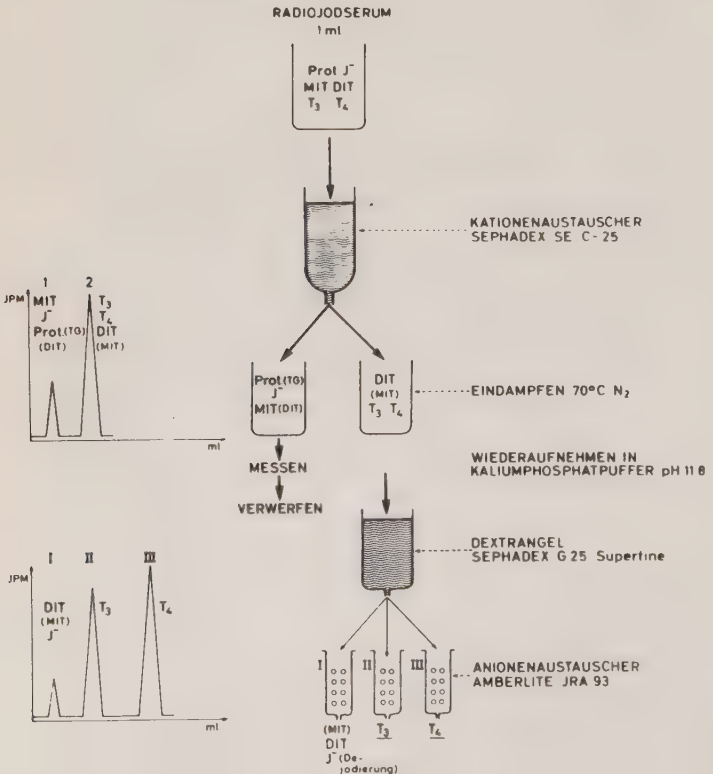
2.4.2. Patienten

Um eine genügend hohe Zählausbeute zu erreichen, wurden Seren von Patienten verwendet, denen mindestens 10 mCi ^{131}J als erste Fraktion der Therapie verabreicht worden war und deren Restschilddrüsengewebe noch speicherte. Das Blut wurde frühestens 48 Std. nach Verabreichung der ^{131}J-Dosis, also in der "Hormonphase", entnommen.

2.4.3. Methodik

Wegen der hohen Impulsraten genügte 1 ml Patientenserum zur Chromatographie. Wie unter 2.2.2. beschrieben, wurde das Serum zunächst auf Ionenaustauscher chromatographiert. Das die Jodthyronine T_3 und T_4 enthaltende Eluat wurde, wie unter 2.3. beschrieben, eingeengt und auf Sephadex G-25 rechromatographiert, siehe (2.1.1. - 6.).

Abb. 14: Auftrennung der Jodaminosäuren im Serum radiojodbehandelter Patienten



Tab. 1: Prozentuale Anteile von Thyreoglobulin (TG), Jodid, MIT, DIT, T_3 und T_4 im Serum radiojodtherapierter Patienten

Für die angegebenen Prozentwerte ($\bar{x}$ + s) gelten folgende Bezugspunkte:

$\left|\begin{matrix}\text{Prot(TG)} + J^- \\ + \text{Tyrosine}\end{matrix}\right|$ in % der Gesamtaktivität Prot(TG) + J^- +MIT +DIT + T_3+T_4

$\left|\text{DIT+(MIT)+}(J^-)\right|$; $\left|T_3\right|$; $\left|T_4\right|$ in % der nach der Dextrangelchromatographie wiedergefundenen Aktivität (MIT)+(J^-)+DIT + T_3+T_4

Diagnose	Name	Messungen	verabreichte Aktivität $^{131}J^-$ in mCi	Speicherung 6h 24h 48h in %	Prot(TG) +J^- + Tyrosine	DIT +(MIT) +(J^-)	T_3	T_4	Q = $\frac{T_3}{T_4}$ x 100
Struma maligna	D.K.	3	200 + TSH	- - -	56,5% ±4,0%	14,6% ±0,6%	3,2% ±0,9%	78,5% ±1,9%	4,1
	M.J.	3	99	4,7 - -	11,5% ±1,6%	4,6% ±1,9%	4,5% ±1,3%	88,8% ±5,3%	5,1
	L.A.	2	200	1,5 0,8	64,1% ± 0,5%	6,9% ±2,1%	11,0% ±1,5%	84 % ±3 %	13,1
	P.M.	2	50	37 59 53	46,5% ± 6 %	10,5% ±4,5%	4,9% ±0,4%	82,7% ±6,2%	5,8
autonomes Adenom	W.J.	1	13	39 52 53	8,5%	3,5%	1,2%	95 %	1,3
kompensiertes toxisches Adenom	D.M.	1	10	16 42 49	10,4%	5,3%	1,8%	93 %	1,9
kompensiertes multiples Adenom	K.M.	1	40	- - -	6,5%	7,4%	3,2%	81,5%	3,8

2.4.5. Spezifität der Methode (siehe auch Abb. 14)

Jodid, ^{131}J-markierte Serumproteine (TG) und ein Teil des DIT werden beim Säurespülen mit 0,1 N Salzsäure von der ersten Austauschersäule eluiert, gemessen und verworfen.
Die Jodthyronine T_3 und T_4 sowie DIT und ein Teil des MIT werden mit Ammoniak eluiert und nach Einengen auf Sephadex G-25 weiter aufgetrennt. Die Wiederfinderate nach den beschriebenen Schritten lag zwischen 65 % und 80 %.
Bei Rechromatographie der Batch-Fraktionen konnten wir keinerlei Verunreinigungen in den einzelnen Peaks finden.

3. DISKUSSION

Seit der Entdeckung durch Gross und Pitt-Rivers im Jahre 1952 (1,18) hat das Trijodthyronin erhebliche Beachtung gefunden. Es zeigte sich nämlich, daß T_3 etwa 5-10 mal stärker biologisch wirksam ist als T_4. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich zum Teil in der wesentlich schwächeren Proteinbindung des T_3, da ja nur das freie, nicht proteingebundene Hormon biologisch aktiv ist (2,17,23).

Man nahm früher an, daß sich die Serumgehalte von T_3 und T_4 wie 1:10 verhalten (17,23). Die bisherigen Routine-Methoden zur Schilddrüsenfunktionsdiagnostik, wie PB^{127}I-Bestimmung (12) und T_4 by column erlauben keine Aussagen über den T_3-Spiegel.

Unter pathologischen Bedingungen ist jedoch damit zu rechnen, daß der absolute T_3-Gehalt im Serum disproportioniert zum T_4-Spiegel verändert ist. Wir denken hierbei vor allem an Morbus Basedow, autonome Adenome und sog. euthyreote Strumen mit niedrigen PB^{127}I-Werten.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode erlaubt die Isolierung von T_3 und T_4 aus Serumproben. Zur Messung des absoluten T_3-Spiegels wäre noch die Bestimmung inaktiven Jods erforderlich. Das soll späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. (Ruhl,T., Dissertation in Vorbereitung).

Dennoch können wir Aussagen treffen über die relative Verteilung der Schilddrüsenhormone im Serum, insbesondere bei Patienten mit Radiojodapplikation.

Die Tab. 1 zeigt die gemessenen relativen T_3- und T_4-Gehalte im Serum radiojodbehandelter Patienten. Der prozentuale radioaktive Anteil des T_3 am Hormonjod ist in der letzten Spalte als Q wiegergegeben.

Nach diesen Messungen schwankt das Verhältnis der Serumspiegel von T_3 und T_4 bei Patienten mit Struma maligna zwischen 1:23 und 1:8; bei Adenompatienten zwischen 1:77 und 1:26. Nach unseren Messungen wäre, wenn man als Norm ein T_3/T_4-Verhältnis von 1:10 zugrundelegt (17,23), auf eine Verschiebung der Spiegel in Richtung T_4 zu schließen (besonders bei Adenompatienten).

Neuere Untersuchungen zeigten auch, daß das Verhältnis von T_3 und T_4 normalerweise wie 1:30 ist (25).

Zur Kritik dieser Technik muß jedoch gesagt werden, daß aufgrund der verschiedenen Halbwertszeiten der beiden Schilddrüsenhormone (5,19) von dem Verhältnis der radioaktiven Hormone her, über das zum Zeitpunkt der Messung vorhandene Verhältnis der absoluten Spiegel von T_3 und T_4, keine exakten Aussagen gemacht werden können. Hinzu kommt, daß bei den gemessenen Patienten infolge der hohen Radiojoddosen - insbesondere bei Patienten mit Struma maligna - mit einer durch Strahlenschädigung gestörten Funktion des Restschilddrüsengewebes gerechnet werden muß. Die hohen Proteingipfel (Thyreoglobulin) bei einigen Patienten (siehe Tab. 1) dürften auf diese Strahlenschädigung der Schilddrüsenfollikel zurückzuführen sein.

Die Abtrennung der Jodtyrosine MIT und DIT kann nach weiterer Verbesserung und Standardisierung zur Funktionsdiagnostik bei Dyshormonogenesen herangezogen werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Beschrieben wurde ein Verfahren, das erlaubt, T_3 und T_4 im Serum zu trennen und deren prozentuale Verteilung zu messen. Dazu waren folgende Schritte nötig:

1. Mit Hilfe eines stark sauren Ionenaustauschers wurden die Hormone aus der Serumproteinbindung abgetrennt.
2. Darauf wurde mittels Dextrangelfiltration eine Methode entwickelt, die es erlaubte, T_3- bzw. T_4-Standards unter Abtrennung der Jodtyrosine MIT und DIT voneinander zu trennen.
3. Die Konzentrierung der Eluate erfolgte auf einem stark basischen Anionenaustauscher.
4. Durch Kombination der einzelnen Schritte wurde die Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Jodaminosäurefraktionen im Serum möglich.

Zudem wurde der Einfluß der Gelmenge, der Temperatur bzw. der Pufferzusammensetzung auf die Trennung untersucht. Alle Versuche wurden sowohl mit Normalserum, dem radioaktive Schilddrüsenhormone zugesetzt waren, als auch mit "endogenem" Schilddrüsenhormon im Serum radiojodtherapierter Patienten, durchgeführt.

5. LITERATUR

1. BANSI,H.W.: Krankheiten der Schilddrüse. In: Handbuch der Inn. Med. 4. Aufl. Bd. 7/1 Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 455

2. BARKER,S.B.: Peripheral actions of thyroid hormons. Fed. Proc. 21, 635 (1962)

3. BOTTERMANN,P.,P.DIETERLE, W.HOCHHEUSER, K.HORN, K.KOPETZ, K.SCHLEYPEN, K.SCHWARZ und P.C.SCRIBA: Zur Frage der endokrinen Nebenwirkungen von Ovulationshemmern. Münchner med. Wochenschr. 109, 685, (1967)

4. BRAVERMANN,L.E., S.H.INGBAR and K.STERLING: Observations concerning the binding of thyroid hormones in sera of normal subjects of varying ages. J. clin. Invest. 45, 1273 (1966)

5. BURKE,G.: The radiothyroxine turnover study in the diagnosis of thyroid disease. Ann. Int. Med. 64, 1208 (1966)

6. DAVIS,P.J.: Factors affecting the determination of the serum protein-bound iodine. J. Med. 40, 918 (1966)

7. DORFNER,K.: Ionenaustauscher - Eigenschaften und Anwendungen. Zweite Auflage. Walter de Gruyter + Co. Berlin (1964)

8. EDELHOCH,H.: The properties of thyroglobulin. J. biol. chem. 237, 2778 (1962)

9. FLODIN, P.: Dextran gels and theyr applications in gel filtration. Dissertation, Uppsala 1962 85pp

10. HEINZE,H.G., K.W. FREY und P.C. SCRIBA: Methoden und Ergebnisse der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik im Bayr. Jodmangelgebiet. Fortschr. Röntg. Nukl. Med. 106, 569 (1968)

11. HORN, K.: Zur Klinischen Bedeutung der Bestimmung der Serumproteinbindung von Schilddrüsenhormonen. Dissertation, Universität München (1966)

12. HORN, K. und P.C. SCRIBA: Zur PB^{127}I-Bestimmung. Technikon Symposion (1970) Sonderdruck Nr. R 863

13. INGBAR, S.H. and N. FREINKEL: Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones. Rec. Progr. Hormon Res.15,353 (1960)

14. KLEIN, E.: Der endogene Jodhaushalt des Menschen und seine Störungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960)

15. KOUTRAS, D.A., W.D. ALEXANDER, W.W. BUCHMANN, J.CROOKS and E.J. WAYNE: Studies of stable iodine metabolism as a guide to the interpretation of radioiodine tests. Acta endocr. (Kbh.) 37, 597 (1961).

16. MERZ, D.P. und B. MEIGEN: Der diagnostische Wert des Zweiphasen-Radiojodtests in endemischen Kropfgebieten. Med. Klin. 61, 411 (1966)

17. NAUMANN, J.A., A. NAUMANN and S.C. WERNER: Total and free trijodothyronine in human serum. J. clin. Invest. 46, 1346 (1967)

18. OBERDISSE, K. und KLEIN, E.: Die Krankheiten der Schilddrüse. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)

19. ODDIE, T.H., J.H.MEADE and D.A. FISHER: An analysis of published data on thyroxine turnover in human subjekts. J. clin. Endocr. 26, 425 (1966)

20. PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, UPPSALA/SCHWEDEN: Leitfaden zur Ionenaustauschchromatographie (1966)

21. ROBBINS, J. and J.E. RULL: Proteins assoziated with the thyroid hormones. Physiol. Rev. 40, 415 (1960).

22. SCHWARZ, K. und P.C. SCRIBA: Diagnostik und Therapie der Schilddrüsenüberfunktion. Med. Klin. 64, 469 (1969).

23. SCRIBA, P.C.,H.G.HEINZE R. LANDGRAF, K.W. FREY und K. SCHWARZ: Klinische Bedeutung der Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextrangelfiltration. Klin. Wschr. 44, 131 (1966).

24. STERLING, K.: Molecular structure of thyroxine in relation to its binding by human serum albumin. J. clin. Invest. 43, 1721 (1964).

25. STERLING, K., D. BELLABARBA, E.S. NEWMAN, M.A. BRENNER: Determination of trijodothyronine concentration in human serum. J. clin. Invest. 48, 1150 (1969).

26. STUMPF,W. und E.H. GRAUL: In vitro-Bestimmung der Schilddrüsenfunktion mit dem Serum-T_3-Test. Med. Klin. 58, 192 (1963).

27. TABACHNICK, M. and N.A. GIORGIO Jr.: Thyroxine protein interactions. II. The binding of thyroxine and its analogues to human serum albumin. Arch.Biochem.Biophys.105,563 (1964)

28. ZACH, O.: Zur Dextrangelchromatographie von Schilddrüsenhormonen. Dissertation, Univ.München (1970)

29. ZEIDLER, U. und H.L. KRÜSKEMPER: Differentialdiagnostischer Wirkungsgrad des ^{131}J-Schilddrüsenfunktionsstudiums. Med. Klin. 63, 212 (1968)

Herrn Priv. Doz. Dr. med. P.C. Scriba
danke ich für die freundliche
Überlassung des Themas und für
seine wertvolle Hilfe.

Besonders herzlich danke ich
Herrn Dr. med. K. Horn, der
mich tatkräftig unterstützte.

L E B E N S L A U F

Am 13. Februar 1946 wurde ich als Sohn des Schuhmachermeisters Georg Hallhuber und seiner Ehefrau Maria Hallhuber, geborene Eimesser, in München geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1952 - 1957 in München. Dort trat ich 1957 in das Asam-gymnasium ein und legte hier im Mai 1966 die Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium begann ich 1966 in München, wo ich 1967 das Vorphysikum und 1969 das Physikum bestand.

Im Frühjahr 1972 werde ich in München das Medizinische Staatsexamen ablegen.